

ULTRAESTRUCTURA DEL MANTO LARVARIO DE ANODONTA CYGNAEA, L.

ULTRASTRUCTURE OF THE LARVAL MANTLE OF ANODONTA CYGNAEA, L.

Mercedes DURFORT (*)

RESUMEN

Los gloquidios, larvas bivalvas propias de los lamelibranquios dulciacuícolas de la familia de los Uniónidos, han sido estudiados al microscopio electrónico de transmisión y de barrido.

Siendo inéditas en la bibliografía las imágenes y los datos aportados sobre la ultraestructura del manto larvario.

Las células epiteliales del mismo, tanto de la cara parietal como de la cara visceral, están totalmente adaptadas a una función trófica, como lo atestiguan los abundantes y esbeltos microvillios que emiten en el seno de una extraordinariamente desarrollada matriz extracelular, constituyendo un auténtico ribete en cepillo.

Importantes cantidades de partículas de β glucógeno e inclusiones lipídicas tipifican las células del manto larvario.

Esta función trófica y respiratoria es de gran interés si se tiene en cuenta que el tubo digestivo todavía no es funcional, careciendo de boca y de ano y que las branquias de la larva todavía no están formadas.

ABSTRACT

Glochidium, bivalve larvae proper to fresh water lamellibranchia, included in the family of Unionida, have been studied by scanning and transmission electron microscopy.

Figures and data about fine structure of the larval mantle, which are reported in this work, are unpublished.

Its epithelial cells of the parietal side as well as the ones of the visceral side, are completely adapted to a trophic function. It is supported by the presence of numerous and gracile microvilli, which spread inside a remarkably developed extracellular matrix, so that they actually form a brush border.

Important quantities of glycogen particles and fatty inclusions characterize the larval mantle cells.

This trophic and respiratory function is of great interest if we consider that the alimentary canal is not yet functional, it lacks mouth and anus and branchia are not yet developed.

Palabras clave: *Anodonta*, Gloquidio, Ultraestructura, Matriz extracelular, Microvillios.

Key words: *Anodonta*, *Glochidium*, *Ultrastructure*, *Extracellular matrix*, *Microvilli*.

INTRODUCCION

El desarrollo larvario de los moluscos de la familia de los Uniónidos despertó el interés de los embriólogos de principios de siglo. Las citas más antiguas sobre este tema correspon-

den a Faussek (1903), a Harms (1909) y a Herbers (1913) que observaron y describieron un estadio sumamente interesante y particular en las primeras etapas del desarrollo de los lamelibranquios dulciacuícolas: el gloquido (= *glochidium*).

(*) Dpto. de Morfología Microscópica, Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. 08028 Barcelona. España.

En el célebre y exhaustivo *Traité d' Embryologie des Invertébrés* de Davidoff (1928) se encuentra una muy detallada descripción de la metamorfosis de esta larva tan especial.

El ciclo reproductor de *Anodonta* ha sido estudiado con bastante detalle, teniendo en cuenta no solamente los rasgos morfológicos sino los factores ecológicos que inciden sobre el mismo, entre otros cabe destacar los trabajos de Lefevre et al. (1919), Arey (1932), Zhadin (1952), Negus (1966) y Brodnie-wicz (1968).

El gloquidio corresponde a la fase de larva velígera de cualquier molusco y se caracteriza por presentar dos valvas triangulares articuladas, una dorsal y otra ventral. El estudio de dichas valvas al microscopio electrónico de barrido ha proporcionado una serie de datos morfológicos que pueden tener interés sistemático, a parte de explicar una serie de comportamientos de dichas larvas. Bajo este aspecto cabe recordar, entre otros los trabajos de Giusti et al. (1975), el de Culliney (1975), así como el de Bradford et al. (1978), que aportan una serie de datos de gran interés.

Los gloquidios se desarrollan en la cámara incubatriz o marsupio, formada por las dos láminas branquiales del molusco hembra. En primavera son liberados al agua, pero dado que todavía no pueden nadar, caerán en el fondo y cuando encontrarán un pez, emitirán el largo y viscoso filamento que tienen, adheriéndose al mismo, como si se tratara de un ancla. una vez establecido el contacto con el pez, la serie de dientes de diversos tamaños

que poseen las dos valvas, se incarán en su tegumento, garantizando de esta manera una perfecta sujeción. Los gloquidios se adhieren preferentemente a las branquias o a las aletas de los teleosteos.

La superficie de las dos valvas de la larva no es uniforme, aparecen series de protuberancias, ordenadamente dispuestas, tanto en la cara dorsal como en la cara ventral (Fig.1 y 2). Dichas protuberancias corresponden a repliegues del manto (Fig.3).

En la presente nota se describirá la ultraestructura del manto larvario al microscopio electrónico de transmisión y de barrido, discutiéndose su papel trófico.

MATERIAL Y METODOS

La procedencia de los ejemplares de *Anodonta* es del Delta del Ebro (Catalunya). Los gloquidios estudiados se han obtenido de dos maneras: (a) recogida después de su emisión por parte de la hembra y (b) por disección de las hembras y extracción de las larvas directamente de las cámaras incubadoras, formadas por las dos láminas branquiales de *Anodonta*. Por ello no todos los gloquidios estudiados tienen el mismo grado de desarrollo.

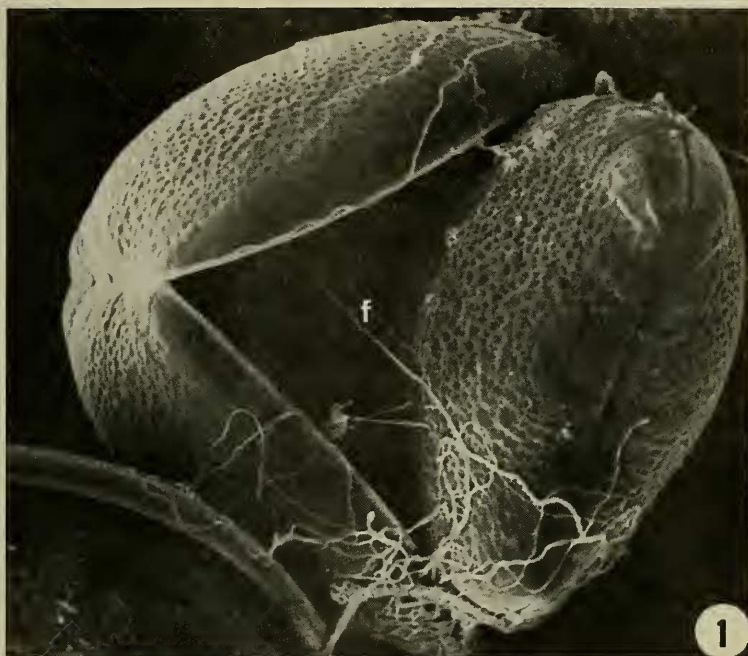
(1) Unos gloquidios han sido sometidos a una digestión previa de la materia orgánica, para lo cual se han seguido dos procedimientos: (a) dejando actuar hidróxido sódico 1N durante una hora a temperatura ambiente (en la proporción de dos gotas de NaOH por 9 ml de agua destilada), siguiendo la técnica recomendada por Bradford et al. (1978) y (b)

Fig. 1.— Imagen al microscopio electrónico de barrido de dos gloquidios de *Anodonta cygnaea*. La posición adoptada por el de la izquierda de la fotografía es la que tiene cuando se adhiere a las branquias o al tegumento de un pez. Obsérvese la emisión del filamento y la textura de las valvas (400 x).

Scanning electron micrograph of two glochidium of Anadonta cygnaea. The position of the one on the left is proper to the moment in which it attaches to the branchia or to the integument of a fish. Notice the filament thrown out and the texture of valves (400 x).

Fig. 2.— Detalle de la seriación de microvillis que emergen del manto larvario y que son responsables del aspecto que tienen las valvas de los gloquidios y de su carácter trófico. (4.250 x).

Detail of a series of microvilli which emerge from the larval mantle and are responsible of the appearance showed by glochidium valves and of its trophic function (4.250 x).



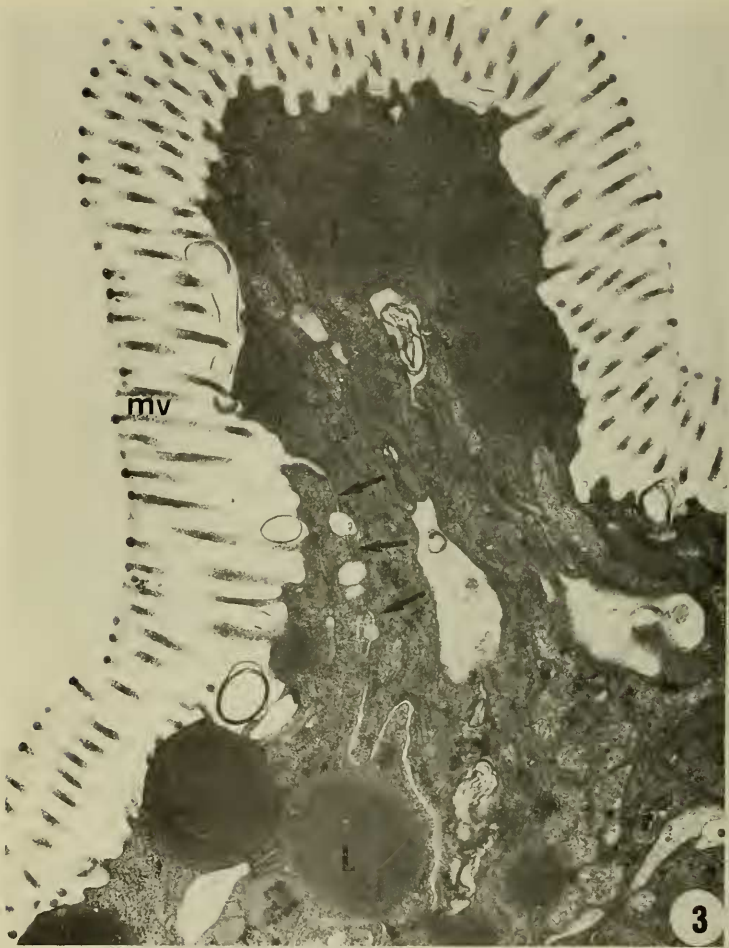


Fig. 3.— Detalle de una emergencia de la capa parietal del manto larvario de *Anodonta cygnaea*. Puede apreciarse la magnífica chapa, así como el largo contacto sinuoso entre dos células epidérmicas, en algunos tramos del cual aparece una unión septada (flecha). Las inclusiones lipídicas (L) son abundantes en este modelo celular. (25.000 x).
Detail of an emergence of the larval mantle parietal layer of Anodonta cygnaea. A splendid microvilli series can be observed, as well as a long sinuous contact between two epidermal cells. In some tracts of this contact a septate union appears (arrow). Lipidic inclusions (L) are abundant in this cellular type (25.000 x).

sometiendo los gloquidios a la acción de una solución acuosa de papaina al 1%, a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

(2) Otro grupo de gloquidios ha sido directamente fijado con glutaraldehído - paraformaldehído al 3,5% tamponado con Sørensen, a pH 7,3 durante 2 horas y posteriormente fijados con OsO_4 al 2%, igualmente tamponado con Sørensen, a pH 7,3 y a 4°C durante 2 horas. Tras cuidadosa deshidratación, pasando las muestras por una serie ascendente de alcoholes o de acetona, y con un tiempo de permanencia en cada paso de 2 horas, se hicieron dos grupos de gloquidios. Un grupo fue procesado para su estudio al microscopio electrónico de transmisión y otro para su estudio al microscopio electrónico de barrido.

El material destinado a ser estudiado al microscopio electrónico de transmisión fue incluido preferentemente en Spurr, resina muy adecuada debido a su escasa viscosidad. La obtención de cortes semifinos y ultrafinos ha sido sumamente laboriosa debido a la consistencia de las valvas, por lo que la cuchilla de vidrio convencional no permite lograr cortes observables, por lo que se ha requerido la utilización de una cuchilla de diamante.

Los cortes ultrafinos han sido contrastados con acetato de uranilo y por el citrato de plomo, preparado según la técnica de Reynolds (1963).

Las larvas destinadas a ser estudiadas con el microscopio electrónico de barrido se sometieron a la acción del acetato de amilo. Con un Polaron (mod. E 2.000) se sometieron a la técnica del punto crítico, utilizando CO_2 (soluble con el líquido de transferencia utilizado, es decir, con el acetato de amilo), y tras esta desecación se procedió al metalizado con oro, mediante la técnica del "sputter-nig" con un Polaron modelo E 5.000, quedando los gloquidios recubiertos por una capa de oro de 300 a 500 Å de grosor.

El material ha sido observado con un microscopio electrónico de transmisión Philips 200 y con un microscopio electrónico de barrido Cambridge modelo 5-4 del Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Barcelona.

Dado el tipo de estudio que llevamos a

cabo, la información ultraestructural aportada por el material procesado por la vía (2) ha sido la más completa.

OBSERVACIONES

La concha de los gloquidios no tiene la misma constitución de las conchas de los individuos jóvenes o adultos, es decir no se diferencian ni el perióstraco, el óstraco i hipostraco. Están únicamente formadas por un manto de particularidades ultraestructurales muy especiales.

El manto larvario de *A. cygnaea* está formado por dos capas de células epiteliales con características ultraestructurales diferenciales.

Capa parietal. Las células epiteliales, endoteliformes, se caracterizan por presentar un citoplasma altamente denso a los electrones, lo cual dificulta en gran manera la observación de las diversas estructuras vesiculomembranosas que alberga.

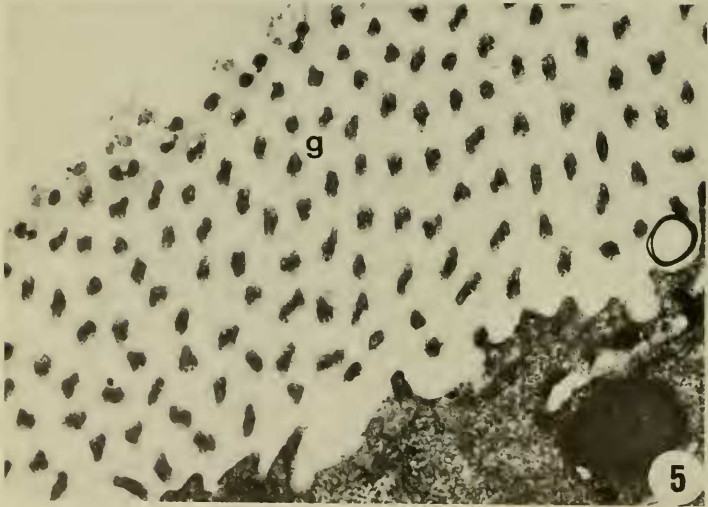
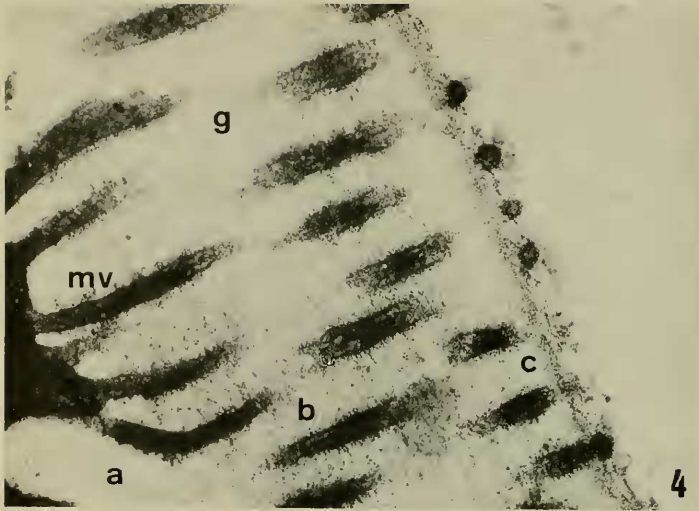
Uniones septadas muy profundas se localizan a nivel del polo apical, siendo una característica peculiar de este material, el hecho de ser muy sinuosa. En ocasiones a la unión septada le precede una mácula adherens. Asimismo se forman algunos canaliculos (Fig.3 y 6).

La membrana del polo apical presenta una muy ordenada secuencia de esbeltos microvilllis de unos 10 μm de altura, distantes unos 0,2 μm y de 0,1 μm de diámetro. El aspecto ultraestructural corresponde a un típico ribete en cepillo (Fig.3, 4, 6, y 7).

El contenido de la evaginación digitiforme es muy denso a los electrones, distinguiéndose formaciones microfibrilares en su interior (Fig.4 y 6).

Una de las características de estos microvilllis, a parte de su larga esbeltez anteriormente mencionada, es el hecho de que terminan formando una dilatación mazuda, en cuyo interior hay una densa condensación citoplasmática (Fig. 4).

Un 10% de los microvilllis aparecen bifurcados hacia la mitad de su recorrido, un 5% se bifurcan casi en la parte apical y un 2% aparecen trifucados; siendo este hecho otra



de las características de las células que forman la hoja parietal del manto de *Anodonta cygnaea*.

Los microvillis están inmersos en una desarrollada matriz extracelular de carácter fibroso. (Fig.4 y 7).

En imágenes bien contrastadas pueden distinguirse tres estratos, atendiendo a la textura y a la densidad del material fibrilar que constituye el glucocáliz (Fig.4, 6 y 7).

El estrato (a), el más próximo al plasmalema, tiene un aspecto muy poco fibroso y escasa densidad a los electrones. Alcanza unos 2 μm de altura.

El estrato (b), es el más desarrollado; mide unos 8 μm de altura, presenta una elevada densidad a los electrones y el material fibroso se halla orientado paralelamente al plasmalema, no perpendicularmente, que es lo más frecuente.

Un tercer estrato, el (c) se distingue a nivel de la zona apical dilatada de los microvillis, como una capa de mayor densidad que las dos precedentes, de unos 0,2 μm de altura.

Exteriormente al estrato (c) aparece un material fibroso vesiculoso, que discontinuamente se dispone sobre o entre los microvillis. (Fig.8).

La membrana basal es muy sinuosa y emite profundas evaginaciones hacia la lámina basal.

El citoplasma presenta tal densidad a los electrones que resulta muy difícil apreciar con nitidez las estructuras que alberga. Esta densidad es en gran parte motivada por numerosos enclaves de partículas de β glucógeno, si bien dichas partículas también se hallan dispersas por el citoplasma.

El núcleo es elíptico y adopta una disposi-

ción basal, ligeramente lobulado, presenta una gran densidad cromatinica, siendo muy difícil distinguir el nucléolo.

Las mitocondrias, con un número de crestas normal, presentan una matriz muy electrodensa. Se distingue una única población mitocondrial. Miden de 1 a 3 μm y son ovoideas, en ocasiones alargadas.

El retículo endoplasmático rugoso se dispone a modo de vesículas paralelas y en el estadio estudiado no se aprecian demasiadas dictiosomas. Posiblemente su actividad haya cesado dado que el glucocáliz presenta su máximo desarrollo.

Los escasos dictiosomas observados están formados únicamente por dos o tres cisternas, escasamente arciformes, con múltiples vesiculitas en la cara de maduración.

A las grandes cantidades de glucógeno, anteriormente mencionadas, debe subrayarse la presencia de algunas gigantescas inclusiones lipídicas, de localización variable, ocasionalmente se encuentran adosadas al plasmalema (Fig.3).

Sus dimensiones oscilan de 1 a 3 μm de diámetro y presentan como dos fracciones, un anillo externo de unos 0,2 μm de grosor.

Se ha podido detectar una cierta relación topográfica entre las inclusiones lipídicas y las mitocondrias.

Efectivamente, las células del manto que pertenecen a larvas más desarrolladas, tienen menos mitocondrias y mayor número de inclusiones lipídicas.

Lámina basal. Muy desarrollada en determinados tramos, está formada por fibras de colágeno dispuestas paralelamente, entre las que se encuentran abundantes partículas de

Fig. 4.— Corte de la valva observado al microscopio electrónico de transmisión. Obsérvese como los microvillis emergidos penetran en una matriz extracelular, fibrosa, altamente desarrollada. Obsérvese asimismo, la textura fibrilar de dichos microvillis (flecha). (38.000 x).
Valve section observed by transmission electron microscopy. Notice how emerged microvilli penetrate into a fibrous, highly developed extracellular matrix. We can also observe the fibrillar texture of these microvilli (arrow) (38.000 x).

Fig. 5.— La misma imagen anterior pero en corte transversal (22.000 x).
The previous figure in cross section (22.000 x).

glucógeno. En otros tramos la lámina basal queda reducida a su mínima expresión.

Capa visceral. Formada por una única capa, más endoteliforme que la de la capa parietal. Sus características citoplasmáticas son muy similares a las anteriormente descritas, con la salvedad que en ellas se localizan muy pocas inclusiones lipídicas y los enclaves de glucógeno son menos abundantes.

La característica de estas células es el hecho de que el plasmalema emite algún que otro microvilli, pero en ningún caso se constituye un ribete en cepillo y la matriz extracelular aparece mucho menos desarrollada.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El carácter casi parasitario que tiene los gloquidios en la cámara incubadora o marsupio (Faussek, 1903) queda evidenciado por el hecho de que el manto sobresalga de las valvas a través de la emisión de múltiples microvillis inmersos en una matriz extracelular extraordinariamente desarrollada.

Se forma un sistema adecuado para asegurar una máxima absorción de nutrientes a la vez que de oxígeno, siendo esto de máximo interés si se tiene en cuenta que la larva tiene únicamente un esbozo de tubo digestivo; la boca y el ano no son todavía funcionales, a la vez que los esbozos branquiales son muy incipientes (Arey, 1932).

El aspecto ultraestructural adoptado por el

polo apical de las células epiteliales del manto es la adecuada para incrementar al máximo su función absorbente, recuerda evidentemente la disposición adoptada por los enterocitos tanto de vertebrados (McNabb et al., 1964; Mukherjee et al., 1971; Trier et al., 1965), así como de los invertebrados (Donadey, 1969; Durfort, 1975; Piquet, 1984).

Así mismo, es muy parecida a la disposición adoptada por las células del epitelio branquial de *Uca mordax* (Finol et al., 1983) a la vez que tiene el colema de los oocitos de *Mytilus edulis* (Durfort, 1973), y la que presentan los oocitos de *Anodonta cygnaea* (Durfort, 1983), y la de los oocitos de lenguado, entre otras especies de teleósteos (Stehr, et al., 1983).

En condiciones anómalas se sabe que hay un hiperdesarrollo de la matriz extracelular, tal es el caso que presenta el oolema de los oocitos de *Mytilus edulis* de ejemplares que han permanecido varias semanas en contacto con los detergentes vertidos al mar para eliminar el petróleo cuando sobreviene la marea negra (Durfort, et al., 1982).

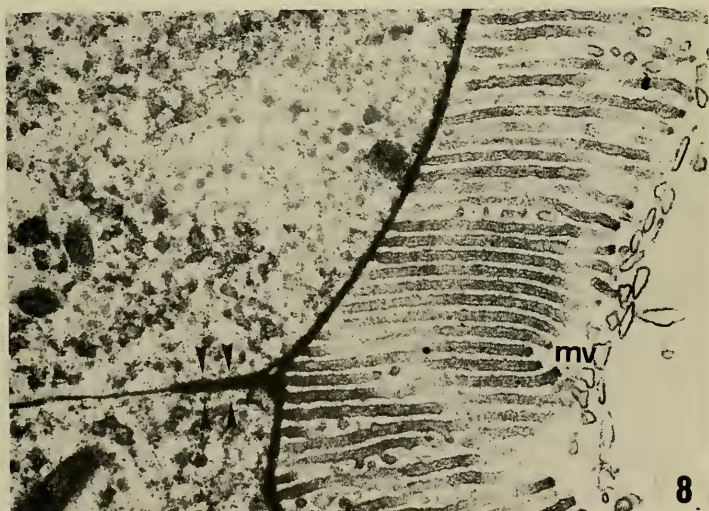
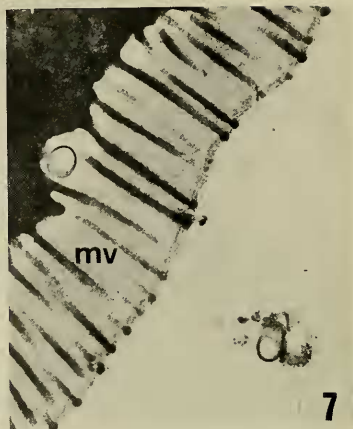
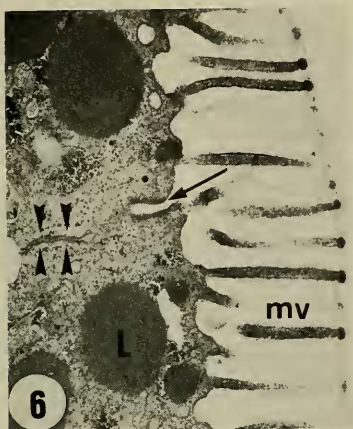
Anodonta cygnaea vive semienterrada en los lodos de los ríos, en condiciones algo anóxicas, por lo cual, el aspecto presentado por el colema de sus oocitos, muy parecido al adoptado por el manto de los gloquidios, sería para aprovechar al máximo la escasa posibilidad de oxígeno que tienen, en general, estos individuos.

En el caso de los gloquidios es evidentemente el sistema más efectivo para cubrir las

Fig. 6 y 7.— Detalles de la matriz extracelular surcada por esbeltos microvillis que indican el carácter trófico del manto larvario de *Anodonta cygnaea*, compárese con la fotografía 8 en la que aparece la chapa de un enterocito del intestino medio de *Diaptomus connexus* (Copépodo dulciacuicola). Las flechas más internas señalan una unión septada y la más externa una formación de endocitosis. (23.500 x).

Details of the extracellular matrix furrowed by slender microvilli, which show the trophic function of the larval mantle of Anodonta cygnaea. Compare with micrograph number 8 in which appears a microvilli series of a mid gut enterocyte of Diaptomus connexus (fresh water copepod). Inner arrows show a septate union. The most external arrow shows and endocytosis formation. (23.500 x).

Fig. 8.—Chapa del enterocito de *Diaptomus connexus* (ver Fig. 6-7) (23.500 X).
Mid gut enterocyte of *Diaptomus connexus* (see Fig. 6-7) (23.500 X).



necesidades tróficas y respiratorias de las larvas, ectoparásitas de peces dulciacuicolas.

BIBLIOGRAFIA

- AREY, L.B. (1932). The nutrition of glochidia during the metamorphosis: a microscopical study of the sources and manner of utilization of nutritive substances. *J. Morphol.*, 53: 201-221.
- BRADFORD, C. & TUMER, R.D. (1978). New Techniques for preparing shells of bivalve larvae for examination with the scanning electron microscope. *Bull. Am. Malacol.*, 17-24.
- BRODNIOWICZ, L. (1968). On glochidia of the genera *Unio* and *Anodonta* from the quaternary fresh water sediments of Poland. *Acta Paleont. Pol.*, 13(4): 619-630.
- CULLINEY, J.L. (1975). Comparative larval development of the shipworms *Bankia gouldi*, and *Teredo navalis*. *Marine Biology*, 29: 245-251.
- DAVIDOFF, C. (1928). *Traité d'Embryologie comparée des Invertébrés*. Masson & Cie., Paris.
- DONADEY, C. (1969). La fonction absorbante des caecums digestives de quelques Crustacés Isopodes marins, étudiée au microscope électronique. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 268: 1607-1609.
- DURFORT, M. (1973). *Ultraestructura de la gónada femenina en algunos Moluscos*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Univ. Barcelona.
- DURFORT, M. (1975). Consideraciones sobre la estructura y ultraestructura del epitelio intestinal de *Mytilicola intestinalis*. *Steuer. Centenario R. Soc. Esp. Hist. Nat. C.S.I.C.*, 109-120.
- DURFORT, M. (1984). Ultraestructura de les valves i del mantell larvari d'*Anodonta cygnaea*, L. *Biologia del Desenvolupament*, 2: 85-93.
- DURFORT, M.; BARGALLÓ, R.; BOZZO, M.G.; FONTARNAU, R. & LÓPEZ-CAMPS, J. (1982). Alterations de ovocytes de *Mytilus edulis*, L. (Mollusca, Bivalva) dues à l'infestation de la moule par *Mytilicola intestinalis*. *Steuer* (Crustacea, Copepoda). *Malacologia*, 22(1-2): 55-59.
- FAUSSEK, V. (1903). Parasitismus der Anodonta-larven. *Mem. Acad. Imp. Sci. St. Petersburg* (8), XIII(6): 141.
- FINOL, H.J. & CROGHAM, P.C. (1983). Ultrastructure of the branquial epithelium of an amphibious brackishwater crab. *Tissue & Cell*, 15(1): 63-75.
- GIUSTI, F.; CASTAGNOLO, L.; MORETTI, L. & RENZONI, A. (1975). The reproductive cycle and the glochidium of *Anodonta cygnaea* L. from Lago Trasimeno (Central, Italy). *Monitore Zool. Ital.*, 9: 99-118.
- HARMS, W. (1909). Postembryonale Entwicklungsgeschichte der Unioniden. *Zool. Jb (Anat.)*, 28: 325-386.
- HERBERS, K. (1913). Entwicklungsgeschichte von *Anodonta cellensis*, Schrot. *Z. Wiss. Zool.*, 108: 1-174.
- LEFEVRE, G. & CURTIS, W.C. (1910). Studies of the reproduction and artificial propagation of fresh-water mussels. *Bull. Bur. Fish. Wash.*, 30: 105-201.
- MCNABB, J.D., & SNADBORN, E. (1964). Filaments in the microvillous border of intestinal cells. *J. Cell Biol.*, 22: 701-704.
- MUKHERJEE, T.M. & STAEHELIN, L.A. (1971). The fine structural organization of the brush border of intestinal epithelial cells. *J. Cell Sci.*, 8: 573-599.
- NEGUS, C.L. (1966). A quantitative study of growth and production of unionid mussels in the river Thames at Reading. *J. Anim. Ecol.*, 35(3): 513-532.
- POQUET, M. (1984). *Ultraestructura del tracto digestivo de copépodos parásitos de peces: Lernanthropus kroyeri van Beneden y Caligus minimus, Otto*. Tesis Doctoral. Facultad de Biología. Univ. Barcelona.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of bead citrate at pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 17: 208-212.
- STEH, R.M. & HAWKES, J.W. (1983). The development of the hexagonally structured egg envelope of the C.O. Sole (*Pleuronichthys coenosus*). *J. Morphol.*, 178: 267-284.
- TRIER, J.S. & RUBIN, C.E. (1965). Electron microscopy of the small intestine: A review. *Gastroenterology*, 49: 574-603.
- ZHADIN, V. (1952). Molljuki presnych i solonovatykh vod SSSR. *Opred. Faune SSSR*, 46: 1-376.

Aceptado: 4-XII-1984